

Aus der Abteilung für Medizinische Physik
der Justus Liebig-Universität Gießen
Abteilungsvorsteher: Professor Dr. R. Herrmann

**Untersuchungen zu Eiweiß-Analysen
mit Hilfe der
Flammen-Emissions-Spektrophotometrie**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Hans-Friedrich Koch
aus Gensungen

Gießen 1970

Aus der Abteilung für Medizinische Physik
der Justus Liebig-Universität Gießen
Abteilungsvorsteher: Professor Dr. R. Herrmann

**Untersuchungen zu Eiweiß-Analysen
mit Hilfe der
Flammen-Emissions-Spektrophotometrie**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Hans-Friedrich Koch
aus Gensungen

Gießen 1970

Aus der Abteilung für Medizinische Physik
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Abteilungsleiter: Professor Dr. R. Habermann

Untersuchungen zu Elweiß-Analysen
mit Hilfe der
Flammen-Fotometer-Spektrophotometrie

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus-Liebig-Universität Gießen



vorgelegt von
Hans-Friedrich Koch
aus Gießen

Dekan: Professor Dr. med. E. Habermann
Referent: Professor Dr. med. R. Herrmann
Korreferent: Professor Dr. med. L. Róka

Gießen 1970

Gliederung

I. Einleitung und Aufgabenstellung

II. Literaturübersicht

- A) Literaturübersicht zu bekannten Eiweißbestimmungen
- B) Literaturübersicht zu C_2 und CH-Banden in Flammen

III. Eigene Messungen

- A) Versuchsanordnung und Aufbau
- B) Flammen und Betriebsbedingungen
- C) Auswahl der günstigen Wellenlängen
- D) Einzelversuche
 - 1. Registrierung der Flammeneigenemission unter Zerstäubung von Aqua dest.
 - 2. Herstellen einer Eiweiß-Modell-Lösung und Zerstäuben mit einem Preßluft-Druck von $1,4 \text{ kg/cm}^2$ und Brennen der Flamme mit einem H_2 -Druck von 200 mmWS
 - 3. Herabsetzung des Preßluft-Druckes von $1,4 \text{ kg/cm}^2$ auf $0,3 \text{ kg/cm}^2$, und nochmalige Zerstäubung und Registrierung
 - 4. Variation der Beobachtungshöhe in der Flamme (bzw. Brenneroberkante und optischer Achse)
 - 5. Variation der Beobachtungshöhe und Zerstäubung mit der neuen kupferfreien Gasdüse
 - 6. Registrierung des Flammenuntergrundes bei 17,5 mm Beobachtungshöhe mit variabel zusammengesetzten Eiweißlösungen
 - 7. Herstellen von Albumin-Lösungen mit jeweils variiertem Na-, Ca- u. K - Gehalt
 - 8. Optimierung durch Variation von Beobachtungshöhe und H_2 -Drucken für eine länger stehende Lösung von 0,25 g Albumin/100 ml
 - 9. Bestimmung optimaler Betriebsbedingungen durch Registrierung verschiedener Flammenprofile

10. Abhängigkeit des Flammenuntergrundes vom Na-Gehalt der zerstäubten Lösung
11. Na-Intensitäten verschiedener Lösungen bei $\lambda = 589 \text{ nm}$
12. Zerstäubung der Lösung von 0,3 g Albumin/100 ml in der H_2 -Pr.Flamme und Registrierung
13. Variation des Eiweißgehaltes und Verdopplung der Na- und Ca- Konzentration
14. Beobachtung der in Versuch Nr. 7 erwähnten Zeitabhängigkeit der Komplexbildung für pulverisiertes Rinderalbumin in Merck-Stammlösung
15. Überprüfung des neuen und des alten pulverisierten Albumins auf Na (bei $\lambda = 589 \text{ nm}$) und Ca (bei $\lambda = 423 \text{ nm}$)
16. Zerstäubung und gleichzeitige spektrale Registrierung von 1/10 mit Aqua dest. verdünntem Human-Serum
17. Spektrale Registrierung beim Zerstäuben von Serumproben in einer Flamme mit reduzierten H_2 -Drucken
18. Spektrale Registrierung beim Zerstäuben von Serumproben in einer H_2 - O_2 -Flamme
19. Spektrale Registrierung beim Zerstäuben von Eichserum Labtrol in einer H_2 -Pr.-Flamme (Wellenlängenbereich zwischen 425 u. 435 nm)
20. Variation der Beobachtungshöhe und der H_2 -Zufuhr beim Zerstäuben von "Labtrol"
21. Abhängigkeit der Flammenuntergrund-Emission von verschiedenen anderen Faktoren
22. Ansauggeschwindigkeit verschiedener Lösungen
23. Einfluß von verschiedenen Na- und K-Konzentrationen zueinander auf den Flammenuntergrund

IV. Zusammenfassung

V. Literatur

VI. Lebenslauf

I. Einleitung und Aufgaben- stellung

Fast alle klinisch-chemischen Laboratorien verfügen heute über ein eigenes Flammenphotometer (genauer: Flammen-Emissions-Filter-Photometer) zur Bestimmung der Elementkonzentrationen von Na, K, Ca in Serum, Blut, Urin usw. Die flammenspectrophotometrischen Verfahren zeichnen sich durch große Schnelligkeit und Empfindlichkeit, dazu noch durch vorzügliche Spezifität aus. Überdies ermöglicht diese Methode ein Übergehen zu voll- oder halbautomatischen Arbeiten, was zu weiteren Zeiteinsparungen führt. Es hat daher in der letzten Zeit nicht an Versuchen gefehlt, der klinischen Chemie weitere Anwendungsmöglichkeiten mit solchen Methoden bzw. Geräten zu eröffnen. Erwähnt sei in diesem Zusammenhang die Bestimmung von Cl^- (BECHTLER und Mitarbeiter, 1) und Hämoglobin (HERRMANN und Mitarbeiter, 2) in biologischen Lösungen. Da organische Bestandteile in den biologischen Flüssigkeiten unter anderem Einflüsse auf die Größe des zwischen den Spektrallinien gelegenen "Kontinuums" (zum Teil auch aus nicht aufgelösten Molekülbanden bestehend) haben, liegt der unseres Wissens bis jetzt noch nicht untersuchte Gedanke nahe, diese Einflüsse auf das Kontinuum z.B. für Bestimmungen des Gesamteiweißgehaltes heranzuziehen. Dazu müssen aber erst alle anderen im biologischen Material vorkommenden Einflüsse auf dies kontinuierliche Leuchten untersucht werden.

Wir haben uns daher zur Aufgabe gestellt, solche Einflüsse, einschließlich des "Eiweißeinflusses" auf das Flammenemissionsspektrum am Beispiel von Modellseren und menschlichem Serum zu untersuchen.

II. A) L i t e r a t u r ü b e r s i c h t z u b e - k a n n t e n E i w e i ß b e s t i m m u n g e n

In der Literatur werden zahlreiche Methoden zur Bestimmung von Gesamteiweiß oder von Albumin bzw. Peptiden beschrieben. SOEJIMA und SUGAWARA (3) haben eine neuere Literaturübersicht zur Bestimmung von Eiweiß mit Hilfe verschiedener Methoden gegeben, auf die wir verweisen. PETERS (4) berichtet, daß das Standards Committee of the AACC Vorschläge gemacht hat zur Normierung der Methoden für Gesamteiweiß-Analysen. Ein neues Molekül-Absorptionsverfahren zur Bestimmung von Albumin im Serum unter Verwendung von Bromcresol-Purpur wird von LOUDERBACK, MEALEY und TAYLOR (5) beschrieben. Eine relativ schnelle chemische Methode zur quantitativen Isolation von menschlichem Serum-Albumin durch Gaben von Trichloressigsäure und Äthanol wird von IWATA, IWATA und HOLLAND (6) dargestellt. MARTINEK (7) untersucht die Vergleichbarkeit von refraktometrischen und Biuret-Methoden zur Bestimmung von Gesamteiweiß im Serum. BURGI, RICHTERICH und BRINER (8) vergrößern die Empfindlichkeit der Biuret-Methode durch UV-Messungen bei 334 nm. MRSKOS, TOVAREK und KOHAVEC (9) bestimmen mit Farbreagenzien Eiweiß in biologischen Flüssigkeiten. Eine Molekül-Absorptionsphotometrische Mikromethode zur Bestimmung von Gesamteiweiß wird von KALTWASSER, WOLTERS und PIEPER (10) beschrieben. IGOU (11) berechnet eine Gel-Filtrations-spektrophotometrische Methode zur Spinalflüssigkeits-Eiweiß-Bestimmung. RITCHIE (12) beschreibt eine einfache, direkte und empfindliche Technik zur Messung von spezifischen Proteinen in verdünnten Lösungen. BEAUCHENE, BARNEKING und Mitarbeiter (13) beschreiben eine Methode zur Analyse von Aminosäuren, die mit Kupfer eine Komplexverbindung eingehen. Den so gebundenen Kupferanteil bestimmen sie anschließend mit Hilfe eines Flammenphotometers. Diese Methode ist für

enzymatisch hydrolisierte Aminosäure-haltige Pflanzenextrakte ausgearbeitet. Ob diese Methode auf Cu-haltiges menschliches Serum übertragen werden kann, erscheint uns fraglich.

II. B) L i t e r a t u r ü b e r s i c h t z u C₂ u n d C H - B a n d e n i n F l a m m e n

Im Prinzip kann man die Emissionen oder auch die Absorptionen und entsprechend die Fluoreszenzerscheinungen in Flammen direkt und auch indirekt für Flammenanalysen heranziehen (Kontinuum durch Temperatur bzw. Bandenemissionen von C₂ oder CH). Wir haben uns für ein direktes Vorgehen entschieden, und zwar für die direkte Beeinflussung des "Flammenuntergrundes" in Wasserstoff-Preßluft-Flammen. GILBERT (14) erwähnt, daß kohlenstoffhaltige Flammen nicht geeignet sind, um Kohlenstoff in Lösungen oder Gasen zu bestimmen, die man in die Flamme bringt. Dagegen ist H₂ der gebräuchlichste, nichtkohlenstoffhaltige Brennstoff zur Bestimmung von Kohlenstoff oder organischen Verbindungen geeignet. Die C₂-Banden werden von SWAN (15) zuerst beschrieben, aber erst später von ATTFIELD (16) richtig als C₂-Banden gedeutet.

Das gesamte Spektrum von CH ist in dem Atlas von BASS und BROIDA (17) spektrophotometrisch aufgezeichnet unter Verwendung einer Sauerstoff-Acetylen-Flamme.

Folgende C₂- bzw. CH-Banden (genauer: Bandenköpfe) werden am häufigsten genannt:

<u>C₂:</u>	<u>CH:</u>
512,9 nm	387,2 nm
516,5 nm	388,9 nm
	431,5 nm
	432,3 nm

Die praktische Bestimmung von Kohlenstoff oder seinen Verbindungen durch spektrophotometrische Flammenemissionen gilt als moderne Entdeckung besonders im Zusammenhang mit der Gas-Chromatographie. Siehe dazu GRANT und VAUGHAN (18), DIPPEL (19), BRAMAN (20), JUVET und DURBIN (21), ROBINSON und SMITH (22), Mc CREA und LIGHT (23).

STOICHEFF (24), FERGUSON und Mitarbeiter (25) experimentieren mit einem Laserstrahl und erhalten von dem zersetzten leuchtenden Dampf ein Spektrogramm mit Banden von C_2 , CN und einer intensiven C^+ -Linie bei 427,7 nm. Mit Niederdruck-System (low pressure system) arbeiten BUOLEWICZ (26) und SAVADETTI (27), wobei letzterer zur Produktion von CH-Banden-Emissionen in Flammen die Anwesenheit von freien Sauerstoff-Atomen und Wasserstoff fordert.

Mit Hilfe dieser Bandenemissionen in Flammen sind auf Grund unserer eigenen Literatur-Recherchen noch keine Gesamt-Eiweißbestimmungen versuchsweise durchgeführt worden.

Wir gehen bei den folgenden Untersuchungen von der Voraussetzung aus, daß die beobachteten CH-Bandenemissionen bzw. die nicht aufgelösten Kontinuum-Intensitäten proportional dem Gesamteiweißgehalt gehen, unabhängig von der Art der Eiweißfraktionen.

III. E i g e n e M e s s u n g e n

A) Versuchsanordnung

Apparatur: Wir benutzen das Spektralphotometer Typ PM 4 QIII der Firma Carl Zeiss (Oberkochen) mit Flammenzusatz Fa I. Bei den Versuchen wurde die in dem Gerät nicht vorgesehene Höhenvariation der Flamme bzw. des Brenners in Bezug auf die optische Achse durch einen Feintrieb an der Brennerhalterung zusätzlich eingebaut und damit erst ermöglicht. Bei den Versuchen 9 und folg. werden Teile der Flamme ausgeblendet mit Hilfe einer zwischen Flammen und Eintrittsspalte befindlichen Blende von 1 cm Ø. Diese Blende bringen wir dicht an den Flammenrand (Prinzip des light-guide nach DEAN (28)). Als Registrierinstrument benutzen wir einen 2-Kanal-Streifenblattschreiber der Firma Linseis/Selb (Bayern) mit einer Eingangsempfindlichkeit von 10 mV. Von dem 2-Kanal-Gerät wird immer nur ein Kanal benutzt, während der andere kurzgeschlossen ist. Selbstverständlich sind wir uns darüber im Klaren, daß ein registrierendes Spektralphotometer in der klinischen Chemie schwer Eingang in die Routine finden wird. Eine solche Methode hat nur Aussicht auf Erfolg, wenn sie mit einem einfachen Filterphotometer durchgeführt werden kann. Wir haben nur deshalb ein Spektralphotometer für unsere Vorversuche gewählt, um alle möglichen Störeinflüsse, auch spektraler Art, besser untersuchen zu können.

B) Benützte Flammen und ihre Betriebsbedingungen

Entgegen den Empfehlungen des Geräteherstellers haben wir die Direktzerstäuberbrennerkombination von Zeiss mit Wasserstoff-Preßluft (H_2 -Fr.) betrieben. Die an sich vom Gerätehersteller vorgesehene H_2 - O_2 bzw. O_2 -Acetylen-Flamme sind für unsere Zwecke weniger geeignet, da sie höhere Temperaturen haben und damit der erwartete Tempera-

tureinfluß des Eiweißes auf die Flamme nicht so groß herauskommen dürfte. Außerdem enthalten die Acetylen-Flammen die C_2 und CH-Banden, die wir ja für die Eiweiß-Analyse ausnützen wollen.

Sofern in den nachfolgenden beschriebenen Versuchen nicht ausdrücklich etwas anderes gesagt ist, wurde die Zerstäuber-Brennerkombination mit einem H_2 -Druck von 400 mmWS (entsprechend einem H_2 -Durchfluß von 15 l/min) betrieben. Der Luftdruck betrug $0,3 \text{ kg/cm}^2$ (entsprechend einem $Pr.$ -Durchfluß von 1,86 l/min). Bei Versuch Nr. 18 wurde zum Vergleich auch einmal die vom Hersteller vorgesehene H_2-O_2 Flamme benützt.

C) Auswahl der günstigsten Wellenlängen

Zur Vermeidung von Störungen anderer Banden und Linien, wie CN, CaO, OH, Ca usw. ist der günstigste Spektralbereich auszuwählen. Tabelle I gibt die Störmöglichkeiten von CN, CaO und OH im H_2 -Pr.-Spektrum an.

Tabelle I: Auswahl von Linien und Banden von CN, CaO und OH im H_2 -Pr.-Spektrum

CN	CaO	OH
355 - 360 nm	544 nm	281 - 295 nm
370 - 390 nm	572 nm	306 - 320 nm
410 - 420 nm	602 nm	342 - 355 nm
	622 nm	
	644 nm	

Um von möglichen störenden Banden oder Linien frei zu sein, registrieren wir über den Wellenlängenbereich (λ) von 420 - 550 nm beim Zerstäuben von verdünnten Seren, da in diesem sonst "freien" Bereich C_2 - und CH-Banden (siehe oben) zu erwarten sind.

D) Einzelversuche

1. Versuch: Registrierung der Flammeneigenemission unter Zerstäubung von Aqua dest.

Diese Flammenemission zeigt im registrierten Wellenlängenbereich von 420 nm bis 550 nm, wie erwartet (siehe oben), keine besonderen Störlinien und ist somit brauchbar.

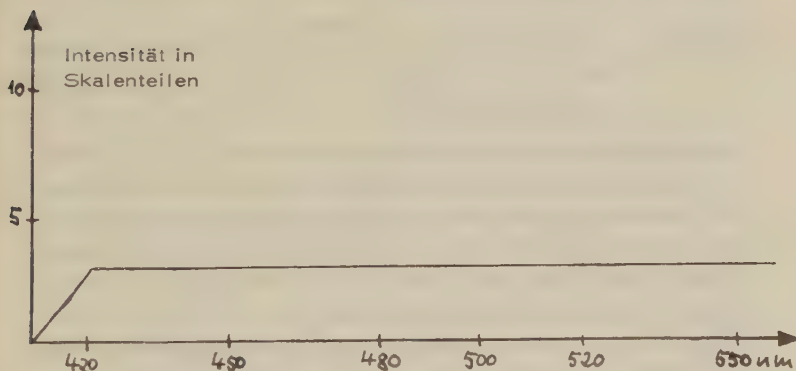


Abb. 1: Registriertes Flammenspektrum zwischen 420 und 550 nm bei Zerstäubung von Aqua dest.

2. Versuch: Herstellen einer Eiweiß-Modell-Lösung und Zerstäuben mit einem Preßluft-Druck von 1,4 kg/cm² und Brennen der Flamme mit einem H₂-Druck von 200 mmWS

Wir stellen folgende Eiweißlösung* her: 1 g pulverisiertes Rinder-Albumin wird in 20 ml Haupteichlösung Merck (Stammlösung Nr. 9976) gelöst. Diese 5 g/100 ml Rinder-Albuminlösung verdünnen wir zum Messen 1:10 mit Aqua dest. Dieser Eiweißgehalt entspricht etwa dem in einem 1/10 verdünnten Serum. Die 0,5 g/100 ml Albuminlösung

* Herrn Prof. L. Růka danken wir für das freundlicherweise zur Verfügung gestellte Rinderalbumin-Trockenpulver.

zerstäuben wir und registrieren über unserem Wellenlängenbereich.

Ergebnis: Im untersuchten Wellenlängenbereich von 420 nm bis 550 nm läßt sich nur die Ca-Linie bei 423 nm erkennen, jedoch keine CH- und C₂-Banden. Anscheinend hat die Flamme unter diesen Betriebsbedingungen zu viel Preßluft und zu wenig Wasserstoff.

3. Versuch: Herabsetzung des Preßluft-Druckes von 1,4 kg/cm² auf 0,3 kg/cm² und nochmalige Zerstäubung und Registrierung

Wir verringern den Pr.-Druck zum Brenner - und damit die Sauerstoffzufuhr zur Flamme - von 1,4 kg/cm² auf 0,3 kg/cm² und behalten den H₂-Druck von 200 mmWS bei. Jetzt registrieren wir die vorgenannte Eiweißlösung (siehe Versuch 2) und kommen unter den gewählten Meßbedingungen zu folgendem Ergebnis:

Bei 423 nm zeigt sich wieder die Ca-Linie, dazu andeutungsweise schwache, vermutlich auf CH zurückgehende Banden bei 431 - 432 nm. Die C₂-Banden sind nach wie vor nicht erkennbar.

4. Versuch: Variation der Beobachtungshöhe in der Flamme (bzw. Brenneroberkante und optischer Achse)

Um die vermuteten CH-Banden aus Versuch 3 noch besser herauszubekommen, variieren wir jetzt die Beobachtungshöhen (auch Brennerhöhe genannt). Unter Beobachtungshöhe verstehen wir also den Abstand von der oberen Brennerspitze bis zur optischen Achse in mm gemessen. Nach BUELL (29) liegt bei dessen Versuchsanordnung bei 432,5 nm ein CH-Emissionsmaximum ca. 12 mm oberhalb der Brennerspitze in einer O₂-H₂-Flamme. Dieses Ergebnis ist wegen der von uns benützten andersartigen Flamme und dem anderen Brenner nicht ohne weiteres

übertragbar. Wir variieren daher systematisch. Wir fangen bei Beobachtungshöhe 26,5 mm an und bekommen sehr kräftige Banden um 436 nm angezeigter Wellenlänge (Anzeige an der Wellenlängenskala von Zeiss). Da diese Banden in allen Fällen auftreten, d.h. unabhängig davon, ob Eiweißlösung oder Aqua dest. zerstäubt worden ist, konnten es im Gegensatz zu unserer Vermutung in Versuch 3 keine CH- oder C₂-Banden sein. Wir haben aufgrund des letzten Ergebnisses folgenden Verdacht:

Das Messing aus der zwar verchromten Messinggasdüse vom Zeiss-Direktzerstäuber-Brenner verdampft wegen der dicht darauf sitzenden Flamme in allen Fällen. Die grünen Banden sind vermutlich auf CuOH oder ähnliche Cu-Verbindungen zurückzuführen und nicht auf CH. Dieser Verdacht wird noch dadurch erhärtet, daß bei Einstellen von höheren Pr.- bzw. H₂-Zufuhren diese Banden kleiner werden bzw. ganz verschwinden. Es ist selbstverständlich, daß bei einer Flamme, die nicht so stark an der Brennerkappe ansitzt, die Brennerkappe nicht so heiß wird und damit weniger bzw. gar kein Cu wegdampt. Da wir auch einen eventuellen Fehler in der Wellenlängenanzeige unseres Spektral-Photometers mittels einer Überprüfung mit der Hg-Lampe (Linie Hg 436 nm) ausschalten, bleibt keine andere Erklärungsmöglichkeit offen. Wir lassen daher in der Werkstatt eine neue Gasdüse aus rostfreiem Stahl anstelle der Messingdüse zur Zerstäuber-Brenner-Kombination von Zeiss anfertigen. Wir registrieren jetzt um 436 nm mit Pr.-Druck von 0,3 kg/cm² und H₂-Drucken von 200 - 500 mmWS, Ergebnis: In keinem Fall zeigen sich die in Versuch 4 gefundenen Peaks mehr. Damit hat sich der zu Beginn geäußerte Verdacht - Peak bei 436 nm geht auf Cu-Verbindung zurück - nach Gebrauch der neuen rostfreien

Gasdüse bestätigt. Im übrigen zeigt dieser Versuch, daß die Reinheit der Brenneroberfläche eine bedeutende Rolle spielt.

5. Versuch: Variation der Beobachtungshöhe und Zerstäubung mit der neuen kupferfreien Gasdüse

Um weiter nach CH-Banden bei 431,5 nm zu suchen, variieren wir die Beobachtungshöhen von 13 - 26,5 mm bei konstantem Pr.-Druck von 0,3 kg/cm² und H₂-Druck von 400 mm WS und vergleichen 1/10 verdünnte Merck-Stamm-lösung Nr. 9976 (Zusammensetzung unverdünnt: Na 330 mg/100 ml oder 143 mval/l; K 15 mg/100 ml oder 3,9 mval/l; Ca 10 mg/100 ml oder 5 mval/l) mit unserer früher an-gesetzten 0,5 g/100 ml Rinder-Albuminlösung. Die oben-geannte verdünnte Lösung von Merck nennen wir im fol-genden kurz: "Merck", die Albuminlösung kurz: "Alb."

Tabelle II: Intensität des Untergrundes bei $\lambda = 425 - 440$ nm in Skalenteilen am Schreibgerät mit gleicher Empfindlichkeit der gesamten Elektronik bei verschiedenen Beobachtungs-höhen

Beob.-Höhe	Merck	Alb.
13 mm	0 Skt	0 Skt
17,5 "	11 "	166 "
26,5 "	20 "	28 "

Diskussion: Deutliche CH-Bandenstrukturen sind in keinem Fall zu erkennen. Bei einer Beobachtungshöhe von 13 mm erhalten wir keine (bzw. nicht aufgelöste Banden-) Kontinuumsintensitäten, bei 17,5 mm Höhe gibt es bei der Zerstäubung der Alb.-Lösung einen sehr hohen Untergrund im Gegensatz zu der von uns zerstäubten Merck-Lösung. Wir folgern daraus: der hohe Untergrund bei 17,5 mm Höhe ist durch Eiweiß bedingt.

6. Versuch: Registrierung des Flammenuntergrundes bei 17,5 mm Beobachtungshöhe mit variabel zusammengesetzten Eiweißlösungen

Wir untersuchen jetzt den zuvor in Versuch 5 gefundenen Eiweißeinfluß auf den Flammenuntergrund, d.h. das Kontinuum zwischen λ von 425 bis 440 nm genauer. Wir halbieren den Eiweißgehalt der alten Albuminlösung. Ferner setzen wir eine frische 0,5 g/100 ml Alb.-Lösung an, die in Aqua dest. gelöst war und nicht in Merck-Stammlösung, wie die erste Alb.-Lösung. Der Sinn dieses Vorgehens ist, herauszufinden, ob der hohe Untergrund bei 17,5 mm Beobachtungshöhe ein reiner Eiweißeffekt ist oder ob andere Einflüsse, wie die der vorhandenen Na, Ca, K - Ionen, dabei eine Rolle spielen. Als Ergebnis bekommen wir für die alte Lösung von 0,25 g Alb./100 ml wie erwartet einen etwa halb so hohen Flammenuntergrund wie für die doppelte Menge Eiweiß. Es besteht hier also eine Proportionalität zwischen Eiweißgehalt der Lösung und Höhe des Flammenuntergrundes. Eine frisch angesetzte Lösung von 0,5 g Alb./100 ml ergibt aber zu unserem großen Erstaunen gar keine Untergrundemissionen. Das bedeutet aber, daß das Eiweiß diese hohen Untergrundemissionen allein nicht auslöst, sondern nur in Verbindung mit den oben erwähnten Ionen.

7. Versuch: Herstellen von Albumin-Lösungen mit jeweils variiertem Na-, Ca- u. K - Gehalt

Wir versetzen die 0,5 g/100 ml wässrige Alb.-Lösung jeweils einzeln mit entsprechenden Konzentrationen von Na^+ , K^+ , Ca^{++} , wie sie in der 1/10 Merck-Stammlösung vorliegen, und registrieren wieder um unseren Wellenlängenbereich von 425 - 435 nm herum. Mit diesen einzelnen Alb.-Ionenlösungen wollen wir herausfinden,

ob ein oder mehrere Ionen für den hohen Flammenuntergrund verantwortlich zu machen sind. Als Ergebnis erhalten wir in keinem Fall eine Erhöhung des Untergrundes.

Diskussion: Wider Erwarten gibt es bei keiner Ionenzusammensetzung mit der frischen Alb.-Lösung eine deutliche Anhebung des Untergrundes, wie es bei der alten länger stehenden Alb.-Lösung des öfteren reproduziert bzw. gemessen werden konnte.

Wir registrieren einen Tag später nochmal unter den gleichen Bedingungen dieselben Lösungen wie zuvor, weil wir an einen Zeitfaktor, z.B. bei der Bildung von Ca-Eiweißkomplexen, denken. Wir erhalten aber die gleichen Ergebnisse wie oben beschrieben. Ein Tag ist wahrscheinlich zu kurz, um eine entscheidende Erhöhung zu bewirken, da die erste Alb.-Lösung (Versuch Nr. 2) ca. 7 Tage gestanden hat. Wir konnten die Frage nach dem vermuteten Zeitfaktor bei der Komplexbildung nicht klären, da zunächst zu wenig pulverisiertes Albumin zur Verfügung stand.

8. Versuch: Optimierung durch Variation von Beobachtungshöhe und H_2 -Drucken für eine länger stehende Lösung von 0,25 g Albumin/100 ml

Wir versuchen, eine bessere Signalhöhe (Nutzausschlag) vom Untergrund herrührend für die alte Lösung von 0,25 g Alb./100 ml durch Variation der Beobachtungshöhe und des H_2 -Druckes herauszuholen. Bei den entsprechenden Registrierungen (hier nicht näher ausgeführt) gelingt das und wir erhalten eine deutliche optimale Erhöhung des Untergrundes bei H_2 -Drucken von 400 mmWS und bei Beobachtungshöhen von 21 - 26,5 mm.

9. Versuch: Bestimmung optimaler Betriebsbedingungen durch Registrierung verschiedener Flammenprofile

Da wir im vorigen Versuch nicht nur eine Erhöhung des Untergrundes, sondern auch gleichzeitig eine Erhöhung des Nutzausschlags (Eiweißausschlag = Gesamtausschlag minus Ausschlag der Eichlösung) haben, bestimmen wir folgende Flammenprofile (Intensitätsanteile in Abhängigkeit von der Höhe) in verschiedenen Beobachtungshöhen:

- a) leerbrennende Flamme
- b) beim Zerstäuben von 1/10 Merck-Stammlösung
- c) beim Zerstäuben von Merck-Stammlösung 1:10 verdünnt mit einer Lösung, die 1 Teil Aqua und 1 Teil Aceton (Volumenangabe) enthält
- d) beim Zerstäuben von 0,25 g Albumin/100 ml (alte Lösung)

Um wirklich exakt ein bestimmtes Volumenelement in definierter Höhe in der Flamme zu messen, haben wir eine Blende von 1 cm Ø vor die Flamme geschaltet (Prinzip des light-guide nach DEAN (28), die wir auch in allen folgenden Versuchen weiter verwenden. Die Intensität wird in Skalenteilen, d.h. in relativen Einheiten (in allen Fällen gleiche Empfindlichkeit) gemessen.

Tabelle III: Messung der Intensitäten verschiedener Lösungen in verschiedenen Beobachtungshöhen, Intensität in Skalenteilen

Beob.- Höhe	Flamme	Lösungen		
		1/10 Merck	1/10 Merck (Aqua + Aceton)	0,25 g Alb./ 100 ml
13 mm	36 Skt	45 Skt	84 Skt	91 Skt
21 "	36 "	54 "	95 "	121 "
26,5 "	32 "	53 "	95 "	126 "
40 "	--	7 "	16 "	52 "

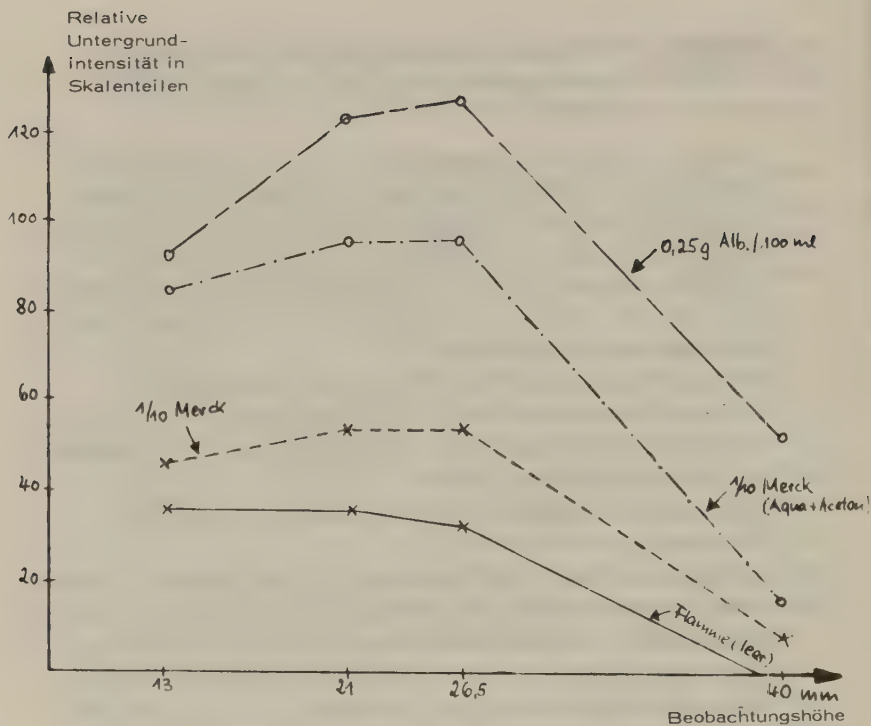


Abb. 2: Flammenprofile verschiedener Lösungen bei variablen Beobachtungshöhen

Aus Tabelle III ergeben sich jeweils die Werte (Intensitäten in Skalenteilen gemessen) für den Nutzausschlag - d.h. unsere Alb.-Lösung - und den Untergrund - d.h. unsere 1/10 Merck-Stammlösung. Durch Subtraktion des Untergrundes vom Nutzausschlag bei verschiedenen Beobachtungshöhen ergibt sich die günstigste Relation (= möglichst große Differenz zwischen Nutzausschlag und

Untergrund) für unsere Versuchsanordnung bei 26,5 mm Beobachtungshöhe. Weitere, hier nicht dargestellte Versuche, zeigen uns, daß wesentlich größere oder kleinere Beobachtungshöhen schlechtere Verhältnisse ergeben. Damit dürften wir hinsichtlich Optimierung der Versuchsbedingungen mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln alles getan haben, was möglich ist, abgesehen von den späteren Versuchen mit "Labtrol" (siehe Versuch Nr. 19).

10. Versuch: Abhängigkeit des Flammenuntergrundes vom Na-Gehalt der zerstäubten Lösung

Es ist aus der Literatur bekannt, daß der Flammenuntergrund u.a. von der Na-Konzentration und der Flammentemperatur abhängt (34). Uns interessiert in diesem Zusammenhang die Frage, ob die Anhebung des Untergrundes mit steigenden Na-Konzentrationen proportional geht, oder ob eine Selbstabsorptionskrümmung zu beobachten ist, wie bei der Na-Resonanzlinie bei $\lambda = 589 \text{ nm}$. Wenn nämlich Proportionalität zwischen Na-Konzentration und Untergrundeinfluß bestände, dann wäre es verhältnismäßig leicht, durch flammenphotometrische Na-Analyse auf der Na 589-Linie auf den Fall zurückzurechnen, daß kein Na den Untergrund beeinflusst, also praktisch nur ein Eiweißeinfluß vorliegt.

Wir registrieren dazu wieder den Untergrund über unseren Wellenlängenbereich um 425 - 435 nm beim Zerstäuben von Lösungen mit steigenden Na-Konzentrationen. Die Intensität messen wir, wie zuvor, in Skalenteilen als relatives Maß.

Diese Beziehungen sind in Abb. 3 wiedergegeben.

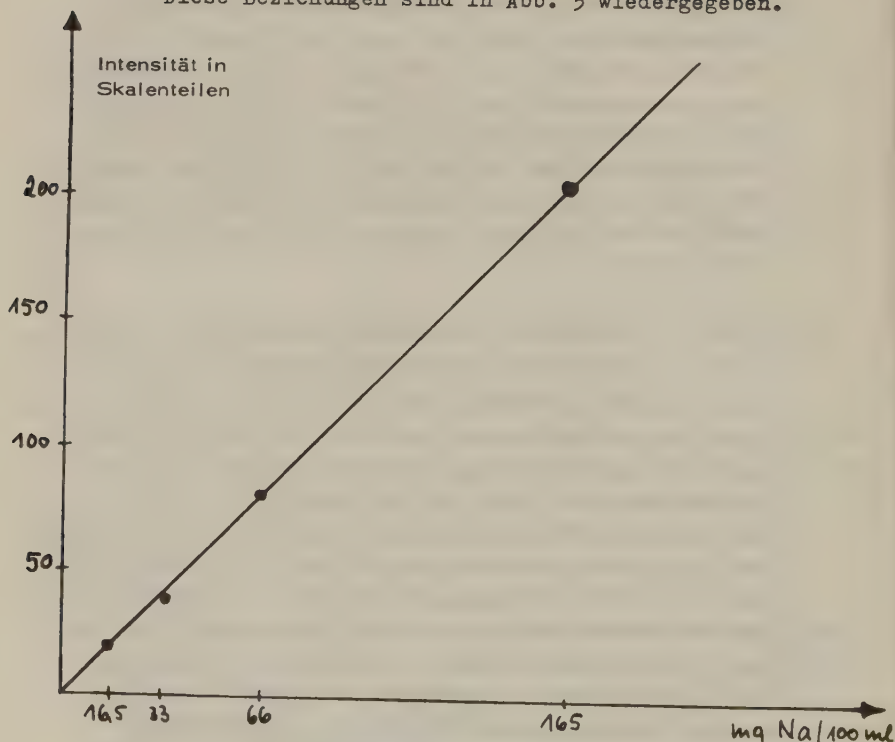


Abb. 3: Untergrundstrahlung bei $\lambda = 425 - 435 \text{ nm}$ für verschiedene Na-Konzentrationen, Intensität in Skalenteilen

Diskussion: Wie aus Abb. 3 zu erkennen ist, beobachten wir - wie übrigens aus theoretischen Gründen zu erwarten war - keine Selbstabsorptionskrümmung der Intensitäten durch den Na-Untergrund bei unseren Wellenlängen zwischen 425 und 435 nm in der $\text{H}_2\text{-Pr.-Flamme}$,

ganz im Gegensatz zur Intensität der Na-Resonanzlinie bei 589 nm. Es besteht eine direkte Proportionalität zwischen dem Na-Gehalt einer Lösung und dem Flammenuntergrund. Wenn in einer Analysenlösung sonst keine Partner sind, die den Untergrund beeinflussen, könnte man diesen Effekt also für Na-Analysen verwenden.

11. Versuch: Na-Intensitäten verschiedener Lösungen bei $\lambda = 589 \text{ nm}$

Wir beschaffen uns 30% neue Rinder-Albuminlösung^{*}, diesmal als Lösung und nicht als Pulver, wie in Versuch Nr. 2. Diese verdünnen wir für unsere Konzentrationsbereiche zunächst 1:10 mit Aqua dest. und untersuchen die Intensitäten folgender Lösungen bei $\lambda = 589 \text{ nm}$:

- a) Aqua dest.
- b) unsere 1/10 Merck-Stammlösung (siehe Versuch Nr. 2)
- c) 0,3 g Albumin (Biotest) /100 ml (verd. 1:10 mit Aqua dest.)
- d) 0,3 g Albumin (Biotest) /100 ml (verd. 1:10 mit 1/10 Merck-Stammlösung).

Letzteres stellt ein Modellserum mit Eiweißgehalt und Serum-Konzentrationen von Na, K und Ca dar.

Wegen der erwarteten Selbstabsorptionskrümmung messen wir in Konzentrationen von 1:10, 1:100 und 1:1000, wobei wir jeweils die Empfindlichkeit unseres Anzeige-gerätes ändern müssen.

* Hersteller: Firma Biotest, Frankfurt/Main

Tabelle IV: Relative Na-Intensität bei $\lambda = 589 \text{ nm}$ für verschiedene Lösungen, Intensitäten gemessen in Skalenteilen

Lösungen	Verdünnungen		
	1/10	1/100	1/1000
a) Aqua dest.	2 Skt.	4 Skt.	
b) Merck Stammlösung	121 "	122 "	97 Skt.
c) Alb. (verd.m. Aqua)	54 "	42 "	41 "
d) Alb. (verd.m. Merck)	126 "	127 "	106 "

Ergebnis:

Wir wissen, daß in unserer 1/10 MerckStammlösung 33 mg Na/100 ml (= 14,3 mval/l) enthalten ist. Aus den Mittelwerten (Verd. 1/1000) unserer Na-Intensitäten errechnen wir, daß in der 0,3 g Alb.-Lösung (Biotest) sich ca. 13 mg Na/100 ml befinden. Die Rückrechnung auf Normalkonzentration gibt folgende Proportion:

$$33 \text{ mg Na/100 ml} = 97 \text{ Skalenteile}$$

$$x \text{ mg Na/100 ml} = 41 \quad "$$

$$x = 13 \text{ mg Na/100 ml}$$

12. Versuch: Zerstäubung der Lösung von 0,3 g Albumin/100 ml in der H₂-Pr.-Flamme und Registrierung

Um zu sehen, ob wir einen Eiweißeffekt bekommen, wie in Versuch Nr. 5 beschrieben, zerstäuben wir unsere 1/10 Merck-Stammlösung im Vergleich mit der im vorigen

Versuch aufgestellten Lösung von 0,3 g Albumin/100 ml (mit 1/10 Merck-Stammlösung verd.) als Modellserum.

Ergebnis:

Unsere Albuminlösung zeigt beim Zerstäuben einen etwas höheren Flammenuntergrund als die vergleichende Merck-Stammlösung. Das kann man nicht unbedingt als Eiweißeffekt deuten, sondern es ist wahrscheinlich ein Na-Effekt, bedingt durch den bereits in der Albumin-Lösung von Biotest enthaltenen Na-Anteil (siehe Versuch Nr.11).

13. Versuch: Variation des Eiweißgehaltes und Verdopplung der Na- und Ca-Konzentration

Um nicht einen etwa doch vorhandenen Eiweißeffekt zu übersehen bzw. einen vorhandenen deutlicher hervorzuheben, führen wir folgenden Versuch durch:

Wir verdoppeln die Konzentrationen in den 1:10 verdünnten Modellseren bezüglich des Na von 33 mg/100 ml auf 66 mg/100 ml und bezüglich des Ca von 1,0 mg/100 ml auf 2,0 mg/100 ml, um die störenden Na - (und evtl. Ca-) Effekte auf den Untergrund - herrührend vom Na-Gehalt der Albuminlösung - relativ klein zu halten. Zu diesen Modell-Lösungen geben wir a) 0,3 g Alb./100 ml und b) 0,6 g Alb./100 ml, im letzten Fall also die doppelte Menge Eiweiß.

Ergebnis:

Nach der Registrierung der Intensitäten erkennen wir deutlicher als zuvor, daß sich geringe Differenzen in den Intensitäten für die verschiedenen Albumin-Konzentrationen zeigen. Wir berechnen jetzt die Differenzen im Einzelnen unter Einbeziehung des Na-Gehaltes im Albumin als Korrektur (hier nicht näher ausgeführt) und müssen erkennen, daß die eben genannten Unterschiede in den Intensitäten doch auf den Na-Gehalt der Albumin-Lösungen zurückgehen und nicht auf den unter-

schiedlichen Eiweißgehalt. Offensichtlich läßt sich unter diesen Bedingungen eine Abhängigkeit der Untergrund-Intensitäten vom Eiweißgehalt nicht feststellen. Daß es uns später (Versuch Nr. 19) mit Labtrol gelingt, mag an der unterschiedlichen Eiweißzusammensetzung und anderen Stoffen im Labtrol-Serum liegen.

14. Versuch: Beobachtung der in Versuch Nr. 7 erwähnten Zeitabhängigkeit der Komplexbildung für pulverisiertes Rinderalbumin in Merck-Stammlösung

Da wir den hohen Flammenuntergrund (siehe Versuch Nr. 5) mit der neuen 30%igen Rinder-Albuminlösung von Biotest (Versuch Nr. 12) nicht reproduzieren konnten, hatten wir den Verdacht, daß diese Lösung eine andere Ionen-Konzentration hat als das Rinder-Albumin-Trockenpulver. Wir besorgen uns daher neues pulverisiertes Rinderalbumin* und stellen die gleichen Lösungen her, wie in den Versuchen Nr. 2, 6 und 7 beschrieben, um für die erwartete zeitabhängige Erhöhung des Untergrundes eine mögliche Komplexbildung untersuchen zu können.

Ergebnis:

14 Tage haben wir jeden Tag die Lösungen 1 - 2 mal zerstäubt und registriert, dabei müssen wir folgendes feststellen:

1) Die erwartete Erhöhung des Untergrundes bei der neu-angesetzten Rinder-Albuminlösung tritt im Laufe der Beobachtungszeit von 14 Tagen nicht ein, obwohl die Meß- und Betriebsbedingungen dieselben sind wie in Versuch 5 und folgende. Lediglich ist der Untergrund, verglichen mit dem beim Zerstäuben der Merck-Stammlösung, geringfügig höher. Das zeigt sich bereits am 1. Tag und bleibt über die weiteren Tage konstant gleich.

2) Auffällig ist, daß bei der Ca-Linie 423 nm der Peak der in Merck-Stammlösung gelösten Albumin-Lösung niedri-

Herrn Prof. L. Róka danken wir abermals für das freundlicher weise zur Verfügung gestellte Rinderalbumin-Trockenpulver.

ger ist, als bei der Merck-Lösung, obwohl die Konzentration an Ca etwa gleich sind.

Diskussion:

ad 2) Der niedrigere Peak bei 423 nm für Calcium in der Albumin-Lösung gegenüber der zerstäubten Merck-Stammlösung ist aus der Literatur bekannt: CHRISTIAN und FELDMANN (30) beschreiben eine geringere Ca-Absorption in Lösungen in Gegenwart von Eiweiß. Diese Ergebnisse sind zwar mit Hilfe der Atom-Absorptionsmethode gewonnen worden, die für unsere Eiweißversuche nicht anwendbar war, da die molekularen Absorptionen in Flammen zu gering sind. Auf der anderen Seite kann man aber Ca-Atomkonzentrationen miteinander vergleichen, gleichgültig ob sie mit der Emissions-, Absorptions- oder Atom-Fluoreszenz-Methode gewonnen wurden. Ebenso finden PIERKE und STAMM (31), daß organische Substanzen im Material (wie bei ihnen z.B. Urin) die Ca-Intensitäten senkt, bzw. daß diese Depression nach Veraschung des organischen Materials nicht mehr auftritt.

ad 1) Da wir bei der früher (in Versuch Nr. 11) erwähnten Lösung von 3 g Alb./100 ml von Biotest eine ähnliche geringgradige Untergrundanhebung gegenüber beim Zerstäuben der Merck-Stammlösung festgestellt und dies auf den Na-Anteil zurückgeführt haben, haben wir den Verdacht, daß die beiden Trockenpulver eine unterschiedliche Ionenzusammensetzung haben. Um das zu überprüfen, führen wir einen weiteren Versuch durch.

15. Versuch: Überprüfung des neuen und des alten pulverisierten Albumins auf Na (bei $\lambda = 589 \text{ nm}$) und Ca (bei $\lambda = 423 \text{ nm}$)

Wir zerstäuben und registrieren das neue pulverisierte Rinder-Albumin und einen Rest des alten pulverisierten Rinder-Albumins (jeweils in Aqua dest. gelöst) bei $\lambda = 589 \text{ nm}$ und bei $\lambda = 423 \text{ nm}$.

Ergebnis:

Wir stellen fest, daß beide Albumine eine geringe Ca-Konzentration besitzen, aber nur die neue Albuminlösung eine deutliche Na-Konzentration aufweist. Der entscheidende Unterschied zwischen den beiden pulverisierten Rinder-Albuminen - vom Versuch Nr. 2 einerseits und dem neuen von Versuch Nr. 14 andererseits - besteht also im Na-Gehalt. Die alte Albumin-Lösung (Versuch Nr. 2) hat praktisch keinen Na-Gehalt. Vielleicht läßt sich damit die damals in Versuch Nr. 14 nicht eingetretene Anhebung des Untergrundes erklären.

16. Versuch: Zerstäubung und gleichzeitige spektrale Registrierung von 1/10 mit Aqua dest. verdünntem Human-Serum

Nachdem wir bisher mit Modellseren experimentiert haben, interessiert uns jetzt die Frage, was finden wir für spektrale Intensitäten, wenn wir menschliches Serum 1:10 mit Aqua dest verdünnen, zerstäuben und registrieren. Als Vergleichslösung für Eichzwecke lassen wir wieder unsere 1/10 Merck-Stammlösung zerstäuben.

Ergebnis:

Überraschenderweise erhalten wir gegenüber der 1/10 Merck-Lösung einen negativen Effekt, d.h. geringere Photoströme im Bereich von 425 bis 435 nm.

Diskussion: Die Konzentrationen an Na^+ , K^+ , Ca^{++} sind aber in beiden Lösungen in etwa gleich. Der wesentliche Unterschied zwischen der Merck-Eichlösung (Modellserum) und den Serumproben besteht im Eiweißgehalt. Als Erklärung für diesen "Negativ-Effekt" nehmen wir folgendes an: Bei systematisch variierten H_2 -Zufuhren zur Flamme wird mit Zusatz von organischem Material das Intensitäts-optimum früher erreicht, als wenn man nur wässrige Lösungen zerstäubt (siehe Abb. 4). Eiweiß wirkt nämlich als organisches Material ähnlich wie Brenngas. Bei Eiweiß-Zufuhr muß also das stöchiometrische Mischungsverhältnis früher erreicht werden.

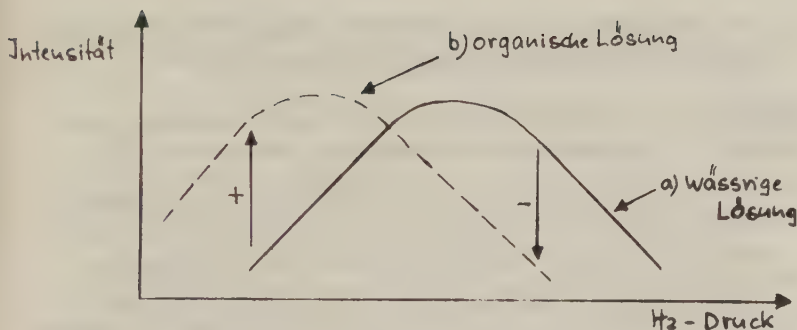


Abb.: 4: Intensitätskurven für a) wässrige b) organische Lösungen bei variablen H_2 -Drucken (schematische Darstellung).

- = negativer Einfluß des Eiweiß

+ = positiver Einfluß des Eiweiß

Um einen positiven Eiweiß-Effekt zu erreichen, müßte man also zu einem niedrigeren H_2 -Druckbereich übergehen (s. Abb. 4), vorausgesetzt, daß die Erklärung richtig ist

17. Versuch: Spektrale Registrierung beim Zerstäuben von Serumproben in einer Flamme mit reduzierten H_2 -Drucken

Um zu prüfen, ob die am Ende von Versuch Nr. 16 gebrachte Erklärungsmöglichkeit richtig ist, registrieren wir bei Pr.-Drucken von 0,3, 0,6 und 0,9 kg/cm^2 mit jeweils entsprechender Reduzierung des H_2 -Druckes, um festzustellen, ob bei sehr ungünstigen H_2 -Pr.-Verhältnissen nicht eine Umkehr des bisherigen negativen Eiweißeffektes erfolgt. Bei jedem Pr.-Druck reduzieren wir den H_2 -Druck von 400 auf 200 und auf 100 mmWS.

Ergebnis:

Der Untergrund der zerstäubten Serumproben bleibt in allen Variationen negativ bezogen auf den Untergrund

der zerstäubten Merck-Eichlösung. Wir müssen daher nach anderen Erklärungsmöglichkeiten Ausschau halten.

18. Versuch: Spektrale Registrierung beim Zerstäuben von Serumproben in einer H_2-O_2 -Flamme

Um zu prüfen, ob der oben in Versuch Nr. 16 gefundene "Negativ-Effekt" eine spezifische Eigenschaft der relativ kühlen H_2 -Pr.-Flamme ist, haben wir im folgenden entsprechende Versuche mit der heißeren H_2-O_2 -Flamme durchgeführt. Zum Vergleich zur H_2 -Pr.-Flamme verwenden wir die H_2-O_2 -Flamme mit einem O_2 -Druck von $0,5 \text{ kg/cm}^2$ und variablen H_2 -Drucken von 100 - 400 mmWS und registrieren die zerstäubten Serumproben und unsere Merck-Eichlösung.

Ergebnis:

Bei H_2 -Drucken von 100 und 200 mmWS gibt es kaum messbare Untergrund-Intensitäten. In keinem der O_2-H_2 -Druckbereiche kommt es zu einer Umkehr des negativen in einen positiven Effekt. Mit beiden Versuchen (Nr. 17 und 18) kann unsere am Schluß von Versuch Nr. 16 erwähnte Theorie nicht bestätigt werden. Aufgrund unserer Ergebnisse haben wir den Verdacht, daß nicht nur die Kontinuumsstrahlung, sondern auch die Linienstrahlung (Atom-Strahlung) der Modellseren "Merck" einerseits und der mit Albuminseren andererseits in recht komplizierter Weise jeweils verschieden geändert werden. Um mit einem fast natürlichen Eichserum Messungen durchzuführen, besorgen wir uns das Modellserum "Labtrol"*. Im übrigen muß man auch bedenken, daß das zugesetzte Albumin (mit leider recht unterschiedlichen Na-Gehalten) keineswegs ein idealer Eiweiß-Ersatz ist.

*

Hersteller: Dade Reagents, Inc., Miami, Florida

19. Versuch: Spektrale Registrierung beim Zerstäuben von
Eichserum Labtrol in einer H_2 -Pr.-Flamme
(Wellenlängenbereich zwischen 425 u. 435 nm)

Wir haben jetzt ein Eichserum mit bekanntem Eiweißgehalt und bekannten Ionen-Konzentrationen, nämlich Labtrol (Zusammensetzung: 6,95 g Eiweiß/100 ml; 330 mg Na/100 ml (= 143 mvalNa/l); 10 mg Ca/100 ml (= 5 mvalCa/l); 19 mgK/100 ml (= 4,7 mvalK/l)). Dazu stellen wir eine Vergleichslösung mit denselben Ionenkonzentrationen zusammen, aber ohne Eiweiß. Wenn wir jetzt eine Differenz in der Höhe des Untergrundes erhalten zwischen beiden Lösungen, so kann das kein Na-Effekt sein, sondern es muß ein Eiweißeffekt sein, wobei wir zur Vereinfachung unter "Eiweiß" alle organischen Bestandteile zusammengekommen verstehen wollen.

Ergebnis:

Wir erhalten geringe Unterschiede in den Untergrund-Intensitäten beider Lösungen. Dabei hat unser Eichserum Labtrol die größere Untergrund-Intensität, also im Gegensatz zu Versuch Nr. 16 und 18 einen positiven Effekt. Um den Anteil des Eiweißes, um den es sich hier offensichtlich handelt, am Untergrund rechnerisch zu erfassen und in % auszudrücken, gehen wir wie folgt vor:

Die Intensität in Skalenteilen der selbst hergestellten synthetischen Vergleichslösung (53 Skt.) setzen wir

= 100 %. Dann berechnet sich die Labtrol-Kontinuum-Intensität (54,5 Skt.): $x = \frac{54,5 \cdot 100}{53} = 102,7 \%$.

Die Differenz von 2,7 % bleibt für den Eiweißanteil am Flammenuntergrund übrig. Da das sehr wenig ist, bemühen wir uns nun, diesen "Positiv-Effekt" durch Optimierung der Betriebsparameter zu vergrößern.

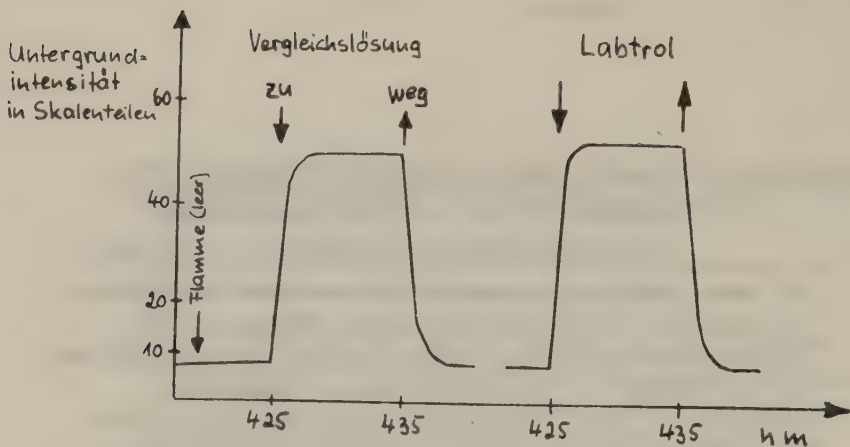


Abb.: 5: Registriertes Flammen-Spektrum bei $\lambda = 425 - 435$ nm nach Zerstäubung von Labtrol und Vergleichslösung

20. Versuch: Variation der Beobachtungshöhe und der H_2 -Zufuhr beim Zerstäuben von Labtrol

Um diesen geringen Effekt zu vergrößern, variieren wir jetzt die Beobachtungshöhe von 14 - 26,5 mm und die H_2 -Zufuhren von 100 - 400 mmWS

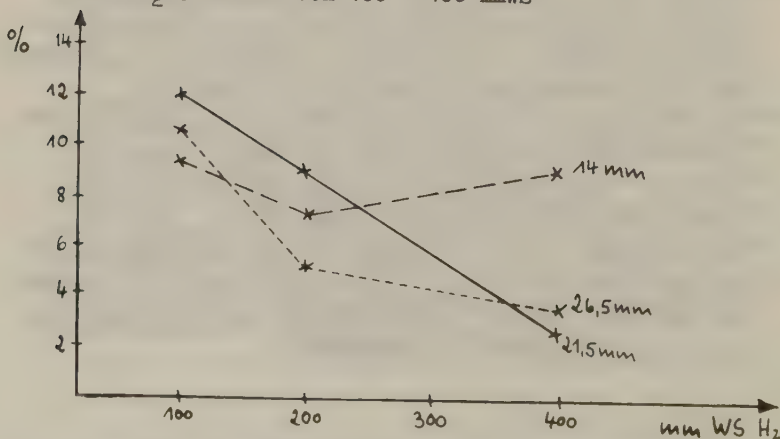


Abb. 6: Eiweißanteil am Untergrund aufgetragen in %

vom Labtrol-Untergrund bei variablen Höhen und H_2 -Zufuhren (Beobachtungshöhe als Parameter).

Ergebnis:

Man erkennt nach Abb. 6, daß bei geringen H_2 -Zufuhren der Eiweißeffekt am deutlichsten - und zwar positiv - herauskommt. Das war zu erwarten, da Eiweiß bekanntlich wie ein organisches Lösungsmittel wirkt und die Flammentemperatur nur in den Bereich heraufsetzen kann, wo ein O_2 , bzw. Pr.-Überschuß besteht. Bei der relativ niedrigen Beobachtungshöhe von 14 mm ist, wie man sieht, die Abhängigkeit der Eiweißanzeige von der Wasserstoffzufuhr gering. Ein Ausblenden anderer Flammenteile ist also in diesem Falle ohne wesentlichen Effekt.

21. Versuch: Abhängigkeit der Flammenuntergrund-Emission von verschiedenen anderen Faktoren

In den letzten Versuchen Nr. 19 und 20 beim Zerstäuben von "Labtrol" erhielten wir, wie anfangs schon erwartet, positive Einflüsse auf die Emission des Flammenuntergrundes. Damit bleibt aber noch die Frage offen, warum wir in den Versuchen Nr. 15 und 16 beim Zerstäuben von Serum jeweils negative Effekte (Verkleinerung der Kontinuum-Strahlung bei Zugabe von Serum) erhielten. Wir haben den Verdacht, daß die noch nicht untersuchten K- und Ca-Konzentrationen dafür verantwortlich gemacht werden können. Wir erinnern an Versuch Nr. 10, wo wir die Proportionalität des Flammenuntergrundes von der jeweiligen Na-Konzentration in der zerstäubten Lösung festgestellt haben. Solche Möglichkeiten der Beeinflussung des Untergrundes wollen wir jetzt, im Hinblick auf den ungeklärten "Negativ-Effekt", untersuchen. Wir zerstäuben jeweils eine Ca- bzw. eine K-Lösung in den für unsere 1:10 verdünnten Seren interessieren-

den Konzentrationsbereichen ($\text{Ca} = 1 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ bzw. $\text{K} = 1,5 \text{ mg}/100 \text{ ml}$).

Ergebnis:

Dabei stellen wir fest, daß K eine geringe Depression des Untergrundes im Vergleich zur leerbrennenden Flamme, Ca eine etwas größere Depression bewirkt, obwohl es geringer konzentriert ist.

Als Erklärung dazu folgendes: Beim Einbringen von Ca in die H_2 -Pr.-Flamme gibt es eine fast spezifische chemische Störung. In der H_2 -Pr.-Flamme ist eine hohe OH-Konzentration, was unter anderem den Untergrund bei brennender Flamme (OH-Banden) bedingt. Zerstäuben wir nun Ca in eine solche Flamme, so bildet sich relativ viel CaOH. Damit verschwindet ein Teil der freien ungeladenen OH-Radikale und der Untergrund wird kleiner. Stattdessen erscheinen an anderen Stellen des Spektrums CaOH-Banden (35). Das Kalium hingegen neigt bei den angewandten Temperaturen nicht oder nicht in dem Maße zu KOH-Bildungen. Mit diesem Ca-Einfluß auf den Untergrund können wir vielleicht einen Teil der früher gefundenen "Negativ-Effekte" erklären. Beim Labtrol konnte dieser Effekt wahrscheinlich deswegen nicht beobachtet werden, da durch die vielen anderen Inhaltsstoffe des Serums bzw. Labtrols mit positivem Einfluß eine Überkompensation auftritt. Dazu gibt es aber noch eine unspezifische Störung für alle Emissionen in fast gleicher Weise, und zwar eine Temperaturerniedrigung der Flamme. Es ist bekannt, daß eine H_2O -Zerstäubung in der Flamme und Verdampfung des Wassers die Flammentemperatur erniedrigen. Zerstäuben wir H_2O und ein Salz, so erfolgt eine langsamere Verdampfung und damit - bezogen auf gleiche Beobachtungshöhe - eine nicht so starke Temperatursenkung. Zerstäubung von Aqua dest. im Direktzerstäuberbrenner allein senkt die Flammentemperatur

stärker und damit die Eigenstrahlung der Flamme. Auch damit kann man erklären, daß die Intensitäten des Lab-trols mit den die Verdampfung behindernden zahlreichen Inhaltsstoffen größer herauskommen müssen. Ferner gilt zu beachten, daß die angesaugte Flüssigkeitsmenge/ pro Zeit (ml/min) infolge Viskositätseffekten, Dichte- und Oberflächen-Spannungsunterschieden verschieden groß sein kann, je nachdem, was zerstäubt wird. Das hat wieder verschiedene Temperatureffekte zur Folge (PÜSCHEL 32). Um das zu prüfen, setzen wir den folgenden Versuch an:

22. Versuch: Ansauggeschwindigkeit verschiedener Lösungen

Wir bestimmen die Ansauggeschwindigkeit folgender Lösungen:

- a) Aqua dest.
- b) 1/10 Na (= 33 mg Na/100 ml)
- c) 1/10 Merck-Stammlösung (= 33 mgNa, 1 mg Ca, 1,5 mgK/100 ml)
- d) 0,5 g Albumin/100 ml
- e) 0,5 g Dextran/100 ml (MG : 40000)

Falls sich bewahrheiten soll, daß verschiedene Ansauggeschwindigkeiten und damit verschiedene Flammentemperaturen bestehen, dann haben diese unterschiedlichen Temperaturen sicher auch Rückwirkung auf die Verdampfungsgeschwindigkeit der in die Flamme hereingebrachten Lösungspartner, dazu auch noch auf die Geschwindigkeit (Höhenverteilung) der Dissoziation und schließlich auf die Größe der Anregung. Wir messen die Zeit zum Ansaugen von je 2 ml Lösung in Sekunden.

Tabelle V: Ansaugzeiten in Sekunden für je 2 ml
verschiedener Lösungen

Lösung	Nr.d.Messung in sec.			Mittelwert	ml/min
	1.	2.	3.		
a) Aqua dest.	43	47	45	45	2,66
b) 1/10 Na	48	45	47	46,5	2,58
c) 1/10 Merck-Stamml.	50	44	46	46	2,61
d) 0,5 g Alb./100 ml	47	47	46	47	2,55
e) 0,5 g Dex-tran/100 ml	49	51	48	49	2,45

Ergebnis:

Man erhält Unterschiede in den Ansauggeschwindigkeiten. Interessanterweise fällt Aqua dest. mit besonders hoher Ansauggeschwindigkeit nach der einen Seite und Dextran mit besonders niedriger Ansauggeschwindigkeit nach der anderen Seite aus der Meßreihe heraus. Um zu prüfen, ob diese Unterschiede reell sind, werden die zwei zuletztgenannten Messungen einige Male wiederholt und die Ergebnisse statistisch weiterverarbeitet und statistisch geprüft.

Wir haben beide Lösungen 20 x immer abwechselnd, wie zuvor beschrieben, gemessen.

Tabelle VI: Messung der Ansaugeschwindigkeiten in Sekunden für Aqua dest.
und 0,5 g Dextran/100 ml

	Nr. der Messung																				Mittel- wert in sec	An- saug- menge ml/min
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	$\bar{X}_M$	
Lösg.	48	51	51	56	52	43	41	43	45	42	55	45	47	54	50	50	48	52	50	52	48,8	2,46
Aqua																						
Dex- tran- Lös.	55	55	58	61	62	52	51	52	55	54	60	57	57	54	56	54	58	57	59	57	56,2	2,14

Auf statistischem Wege wird die Signifikanz geprüft nach KOLLER (33)

Tabelle VII: Statistische Auswertung für die Lösung
von 0,5 g/100 ml Dextran

	x_n	$IM - x_{nI}$	$(IM - x_{nI})^2 = \Delta^2$
1	55	1,2	1,44
2	55	1,2	1,44
3	58	- 1,8	3,24
4	61	- 4,8	23,04
5	62	- 5,8	33,64
6	52	+ 4,2	17,64
7	51	5,2	27,04
8	52	4,2	17,64
9	55	1,2	1,44
10	54	2,2	4,84
11	60	- 3,8	14,44
12	57	- 0,8	0,64
13	57	- 0,8	0,64
14	54	2,2	4,84
15	56	0,2	0,04
16	54	2,2	4,84
17	58	- 1,8	3,24
18	57	- 0,8	0,64
19	59	- 2,8	7,84
20	57	- 0,8	0,64
$\Sigma = 1124$		$\Sigma \Delta^2 = 169,20$	
$M_1 = 56,2$		$\Sigma \frac{\Delta^2}{n-1} = \frac{169,20}{19} = 8,90$	
		$\sqrt{\frac{\Delta^2}{n-1}} = 2,98 = \sigma_1$	

Tabelle VIII: Statistische Auswertung für die Lösung von 0,5 g/100 ml Aqua dest.

	X_n	$IM - X_{nI}$ $= \Delta$	$(IM - X_{nI})^2$ $= \Delta^2$
1	48	0,8	0,64
2	51	- 2,2	4,84
3	51	- 2,2	4,84
4	56	- 7,2	51,8
5	52	- 3,2	10,24
6	43	5,8	33,64
7	41	7,8	60,84
8	43	5,8	33,64
9	45	3,8	15,44
10	42	6,8	46,24
11	55	- 6,2	38,44
12	45	3,8	15,44
13	47	1,8	3,24
14	54	- 5,2	27,04
15	50	- 1,2	1,44
16	50	- 1,2	1,44
17	48	0,8	0,64
18	52	- 3,2	10,24
19	50	- 1,2	1,44
20	52	- 3,2	10,24

$$\sum = 975$$

$$M_2 = 48,8$$

$$\sum \Delta^2 = 371,76$$

$$\frac{\sum \Delta^2}{n-1} = \frac{371,76}{19} = 19,57$$

$$\sqrt{\frac{\Delta^2}{n-1}} = 4,42 = G_2$$

nach KOLLER:

aus Tafel 7 : $\tau = 3,22$

für 38 Freiheitsgrade

$$\begin{aligned}\sigma_{\text{Diff.}} &= \sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}} \\ &= \sqrt{\frac{8,90}{20} + \frac{19,57}{20}} \\ &= \sqrt{\frac{28,47}{20}} \\ &= \sqrt{1,424} = 1,194\end{aligned}$$

$$M_1 - M_2 = 56,2 - 48,8 = 7,4$$

$$\tau \cdot \sigma_{\text{Diff.}} = 3,22 \cdot 1,194 = 3,84$$

Diskussion: Mit Hilfe des genannten Prüfkriteriums kann Signifikanz der Unterschiede der beiden Mittelwerte statistisch bewiesen werden.

23. Versuch: Einfluß von verschiedenen Na- und K-Konzentrationen zueinander auf den Flammenuntergrund

Um den Einfluß von verschiedenen Konzentrationen von Na und K, jedes für sich variiert, auf die Untergrund-Emission der Flamme zu studieren, stellen wir eine Reihe von Lösungen her: Zunächst Lösungen mit jeweils dem gleichen Na-Gehalt von 33 mg Na/100 ml, aber verschiedenen K-Gehalten, variiert von Null bis 1,5 mg K/100 ml. Dto. drei weitere entsprechende Reihen mit vermindertem Na-Gehalt, und zwar 0, 0,33 und 3,3 mg Na/100 ml.

Tabelle IX: Variierte Na- und K-Konzentrationen,
Intensitäten des Untergrundes in Skalenteilen nach Zerstäubung

Konz. für K ⁺ in mg K/100 ml	Konz. für Na ⁺ in mg Na/100 ml			
	0	0,33	3,3	33
1,5	5 Skt.	5,8 Skt.	11,5 Skt.	72 Skt.
0,15	1,7 "	1,8 "	8 "	68,5 "
0,015	0,8 "	1,8 "	7,5 "	68,5 "
0	0 "	1,2 "	8 "	71 "

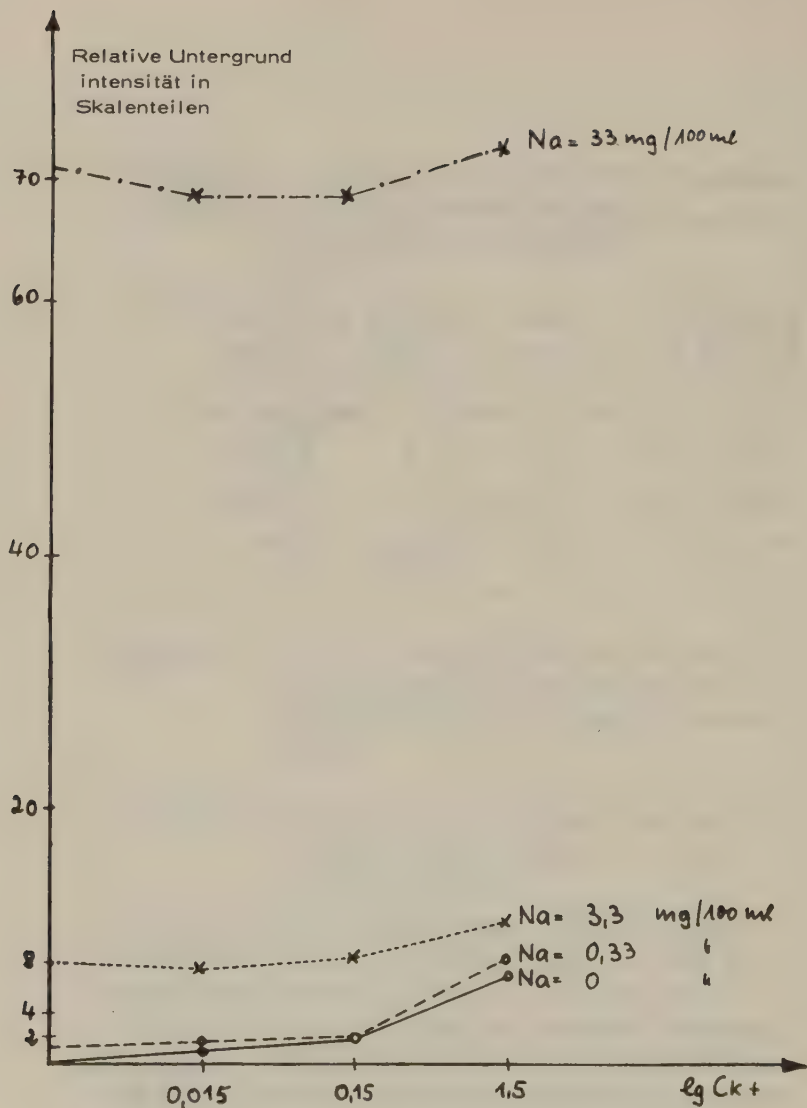
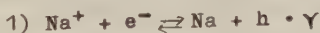


Abb. 7: Intensität des Flammenuntergrundes in Skalenteilen aufgetragen für Na-Konzentr. von 0 - 33 mg/100 ml als Parameter und K-Konz. von 0 - 1,5 mg K/100 ml (Abszisse) zwischen 425 und 435 nm

Ergebnis:

Man sieht, daß der Haupteinfluß auf den Untergrund das Na hat. Der Grund ist in der mehr als 10 x höheren Na-Konzentration als der K^+ im Serum zu sehen. Interessanterweise wirkt sich ein - und dieselbe K-Zugabe bei niedriger und hoher Na-Konzentration anders aus. Bei niedriger Na-Konzentration mit relativ hoher Na-Dissoziation bewirken K-Zusätze im mittleren Konzentrationsbereich um 0,15 g/100 ml eine geringfügige Abnahme der Steigung bei trotzdem anhaltender monotoner Steigung der Gesamtkurve (siehe Abb. 7). Bei hohen Na-Konzentrationen mit relativ niedrigen Dissoziationen bewirken jedoch die K-Konzentrationen zunächst eine Abnahme der Kurve, um bei höheren K-Konzentrationen wieder eine Zunahme zu verursachen (siehe Abb. 7 oben). Zur Erklärung möchten wir folgendes anführen:

Für beide Kontinuum-Anteile gelten prinzipiell folgende zwei Gleichungen:



Diese sind aber insofern nicht gleichwertig, als das K^+ aufgrund der kleineren Ionisationsenergie stärker ionisiert ist als das Na^+ ($E_{ion} Na^+ = 5,14$ eV, $E_{ion} K^+ = 4,34$ eV). Nun gilt aber beim Hauptpartner Na mit der größten Konzentration im biologischen Material das Massenwirkungsgesetz (MWG)

$$K_t = \frac{[Na^+] \cdot [e^-]}{[Na]}$$

Dies gilt im Prinzip natürlich auch beim K, jedoch wirkt es sich wegen der geringen K-Konzentration kaum aus. Wenn man in diesem MWG die Elektronen - Konzentration aus einer anderen Quelle (in unserem Falle K-Zugabe) erhöht, so muß im Zähler des MWG die Elektro-

nen-Konzentration ansteigen und entsprechend die Na^+ -Konzentration abnehmen. Das bewirkt aber eine Minderung des Na-Kontinuums. Bei hohen K-Konzentrationen wird dieser Effekt keine Rolle mehr spielen, weil dann das K, relativ zum Gesamtgehalt, weniger stark dissoziiert ist. Bei niedrigen Na-Konzentrationen findet man den gleichen Effekt, jedoch weniger stark ausgeprägt, bedingt dadurch, daß die relative Na-Dissoziation größer ist. Das mehr oder weniger stark dissoziierte K^+ kann sich in diesem Fall nicht so stark auswirken, weil die Na-Dissoziation überwiegt.

IV. Z u s a m m e n f a s s u n g

- 1) Es konnte gezeigt werden, daß Eiweiß die Größe des Flammenuntergrundes der H_2 -Preßluft-Flamme im Spektralbereich von 425 bis 435 nm beeinflußt.
- 2) Für eine flammenphotometrische Analyse des Gesamteiweisses im Serum ist dieser Effekt aus folgenden Gründen wenig geeignet:
 - a) Die Strahlung zeigt mit üblichen Monochromatoren keine spezifische Bandenstruktur, sondern eine kontinuumähnliche unspezifische Strahlung.
 - b) Diese Strahlung nach a) wird von einer Reihe weiterer Lösungskomponenten, z.B. Na, K und Ca, mitbeeinflusst. Erschwerend kommt hinzu, daß diese Einflüsse z.T. verschiedene Vorzeichen haben.
- 3) Nebenher konnte gezeigt werden, daß die oben genannten Effekte des Eiweisses auf die Flammenstrahlung auch davon abhängen, ob z.B. Ca mehr oder weniger komplex an das Eiweiß gebunden ist. Damit könnte u.U. diese Methode zur Bestimmung von Komplex-Bildungsgeschwindigkeiten herangezogen werden.

V. L i t e r a t u r

1. BECHTLER, G.; GUTSCHE, B.; HERRMANN, R.
Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem.,
5, 138 (1967)
2. HERRMANN, R.; LANG, W.; STAMM, D.
Blut XI, 135 (1965)
3. SOEJIMA, J.M.; SUGAWARA, K.
Nagakuto Subutsu, 4, 37 (1966)
Chem. Abstr., 68, 735 (1968)
4. PETERS, T.
Clin. Chem., 14, 1147 (1968)
5. LOUDERBACK, A.; MEALEY, E.H.; TAYLOR, N.A.
Clin. Chem., 14, 793 (1968)
6. IWATA, T.; IWATA, H.; HOLLAND, J.F.
Clin. Chem., 14, 22 (1968)
7. MARTINEK, R.G.
Proc. Ass. Clin. Biochem.,
3, 264 (1965)
Chem. Abstr., 67, 26729 (1967)
8. BURGI, W.; RICHTERLICH, R.; BRINER, M.
Clin. Chim. Acta, 15, 184 (1967)
9. MRSKOS, A.; TOVAREK, J.; KOHAVEC, J.
J. Czech., 117, 519 (1966)
10. KALTWASSER, F.; WOLTERS, P.; PIEPER, J.
Clin. Chim. Acta, 15, 347 (1967)
11. IGOU, P.C.
Am. J. Med. Technol., 33, 354 (1967)
12. RITCHIE, R.-F.
J. Lab. Clin. Med., 70, 512 (1967)

13. BEAUCHENE, R.E.; BARNEKING, A.D. et alii
J. Biol. Chem., 214, 431 - 439 (1955)
14. GILBERT, P.T.
Ed.: R. Maurodineau, Philips
Laboratories (1968)
15. SWAN, W.
Trans. Roy. Soc. Edinburgh,
21, 411 - 29 (1857)
16. ATTFIELD, J.
Phil. Trans. Roy. Soc. London,
152, 221 - 4 (1862)
17. BASS, A.M.; BROIDA, H.P.
Natl. Bur. Standards, Monograph 24 (1961)
18. GRANT, D.W.; VAUGHAN, G.H.
p. 413 in "Vapour Phase Chromatography"
D.H. Desty, ed., Butterworths, London 1957
19. DIPPEL, W.A.
Ph. D. thesis, Princeton Univ.,
167 pp. (1954)
Dissertation Abstr., 16, 224 - 5 (1956)
20. BRAMAN, R.S.
Anal. Chem., 38, 734-42 (1966)
21. JUVET, R.S.; DURBIN, R.P.
Anal. Chem., 38, 565 - 9 (1966)
22. ROBINSON, J.W.; SMITH, V.
Anal. Chim. Acta, 36, 489-98 (1966)
23. MCCREA, P.F.; LIGHT, T.S.
Anal. Chem., 39, 1731 - 6 (1967)
24. STOICHEFF, B.P.
pp. 399 - 415 in Proc. Xth Colloquium
Spectroscopicum Internationale, E.R.
Lippincott und M. Margosher, eds. Spar-
tan Books, Washington 1963

25. FERGUSON, H.J.S.
Nature, 204, 1295 (1964)
26. BULEWICZ, E.M.
Combust. Flame, 11, 297 (1967)
27. SAVADETTI, M.J.; BROIDA, H.P.
Western States Combust. Inst.,
Paper WSS - C/66 - 13, 12 pp (1966)
28. DEAN, J.A.; ADKINS, J.E.
Analyst. (London), 91, 709 (1966)
29. BUELL, B.E.
Anal. Chem., 35, 372 (1963)
30. CHRISTIAN, G.D.; FELDMANN, F.J.
Anal. Chim. Acta, 40, 173 (1968)
31. PIERKE, K.M.; STAMM, D.
"Bestimmung von Na, K, Ca im Harn
mit Filterflammenphotometer"
Z. Klin. Chemie im Druck 1970
32. FÜSCHEL, R.
"Über die erreichbaren Na-Atomkonzentra-
tionen in turbulenten H_2-O_2 -Flammen"
(Diplomarbeit) Gießen 1962
33. KOLLER, S.
"Neue geographische Zahlen zur Beur-
teilung statistischer Zahlen"
Steinkopf-Verlag Darmstadt (1969)
34. ALKEMADE, C.T.J.
Coll. Spectr. Internat. VIII 1959 Luzern
35. HULDT, L.; LAGERQUIST, A.
Ark. Fys., 9, 227 (1955)

Herrn Prof. Dr. R. Herrmann danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor und für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen bei meinen Versuchen.

Herrn Prof. Dr. L. Róka gilt mein Dank für die Beschaffung und Bereitstellung von Versuchsmaterial.

VI. Lebenslauf

Als Sohn des Tierarztes Friedrich Koch und dessen Frau Hildegard, geb. Janssen, bin ich am 9. 9. 1943 in Kassel geboren. Von Ostern 1950 - 1954 besuchte ich die Volksschule in Gensungen und ging anschließend auf das humanistische Friedrich-Gymnasium in Kassel, wo ich am 27. 2. 63 das Abitur bestand.

Danach ging ich 2 Jahre zur Bundeswehr, wo ich im März 1965 als Leutnant der Reserve entlassen wurde.

Im Sommersemester 1965 begann ich in Gießen Medizin zu studieren, absolvierte im Frühjahr 1966 das Vorphysikum und im Herbst 1967 das Physikum.

Das Staatsexamen habe ich am 22. 1. 1971 abgelegt.

FOTO-DRUCK LENZ · 63 Gießen · Riegelpfad 32/Ecke Ludwigstraße
Telefon 0641-77449